

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年3月11日 (11.03.2004)

PCT

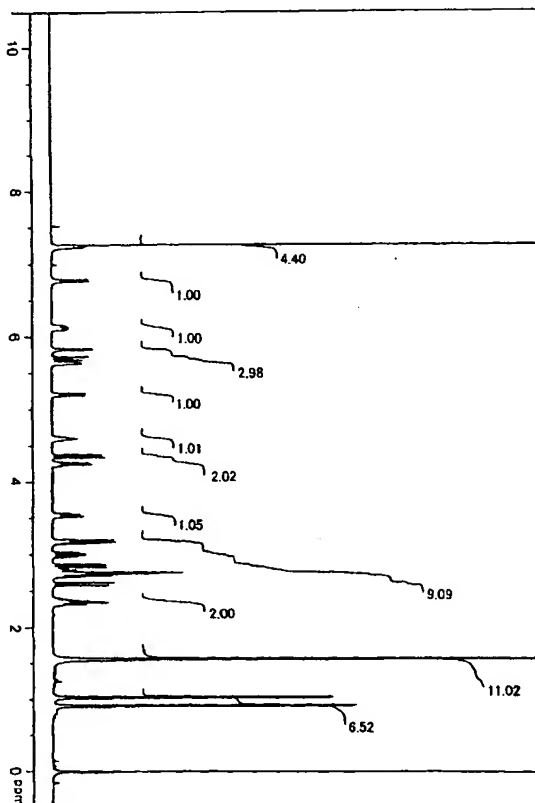
(10) 国際公開番号  
WO 2004/020460 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 5/027, CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).  
C12P 21/02, A61K 38/00, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010957 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永井 浩二 (NAGAI,Koji) [JP/JP]; 〒174-8511 東京都板橋区小豆沢一丁目1番8号 山之内製薬株式会社内 Tokyo (JP). 谷口 昌要 (TANIGUCHI,Masatoshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 新堂 信昭 (SHINDO,Nobuaki) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 寺田 央 (TERADA,Yoh) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 森 政道 (MORI,Masamichi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 網野 伸明 (AMINO,Nobuaki) [JP/JP]; 〒305-8585
- (22) 国際出願日: 2003年8月28日 (28.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-255141 2002年8月30日 (30.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL

[続葉有]

(54) Title: NOVEL DEPSIPEPTIDE COMPOUND

(54) 発明の名称: 新規なデプシペプチド化合物



(57) Abstract: A novel compound which is useful as a preventive or a remedy for diseases in which HDAC participates, in particular, tumor and cell proliferative diseases. A depsipeptide compound or its pharmaceutically acceptable salt has a favorable HDAC inhibitory effect and an activity of inhibiting the proliferation of human cancer cells and, therefore, is useful in treating and improving diseases and pathogenic conditions in which histone acetylation participates, in particular, tumor and cell proliferative diseases.

(57) 要約: HDACの関与する疾患、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の予防若しくは治療剤として有用な新規化合物に関する。本発明のデプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩は、良好なHDAC阻害作用並びにヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有し、ヒストンのアセチル化の関与する疾患や病態、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の治療及び改善に有用である。

WO 2004/020460 A1



茨城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 鈴木 謙一 (SUZUMURA, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 高橋 勇夫 (TAKA-HASHI, Isao) [JP/JP]; 〒174-8511 東京都 板橋区 小豆沢一丁目 1 番 8 号 山之内製薬株式会社内 Tokyo (JP). 天瀬 光雄 (AMASE, Mitsuo) [JP/JP]; 〒174-8511 東京都 板橋区 小豆沢一丁目 1 番 8 号 山之内製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 長井 省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都 板橋区 蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,

NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 新規なデブシペプチド化合物

## 技術分野

本発明は医薬、殊にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤及び抗腫瘍剤として有用な、新規なデブシペプチド化合物に関する。

## 背景技術

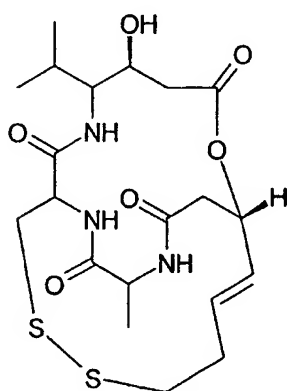
ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル化酵素（ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(Histone Acetyltransferase); HAT）とヒストン脱アセチル化酵素（ヒストンデアセチラーゼ(Histone Deacetylase); HDAC）とのバランスによって制御されていることが知られており、近年、いくつかの HAT 並びに HDAC が同定されその転写調節における重要性が報告されている（Ogryzko,V.V. et al Cell 87, 953-959, 1996、Brown,C.E. et al Trends Biochem.Sci. 25(1), 15-19, 2000、Grozinger,C.M. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96, 4868-4873, 1999）。

一方で、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導など多彩な作用を有する酪酸は、細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、HDAC 阻害作用を有することが以前より知られていた（Counsens,L.S.et al J.Biol.Chem. 254, 1716-1723, 1979）。また、微生物代謝産物の Trichostatin A (TSA)は細胞周期の停止、分化誘導を示し（Yoshida,M. et al Cancer Res 47, 3688-3691, 1987、Yoshida,M. et al Exp.Cell Res 177, 122-131, 1988）、アポトーシスを誘導することが見出された。TSA は細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、部分精製した HDAC を用いた検討から TSA が強力な HDAC 阻害剤であることが明らかとなった（Yoshida,M. et al J.Biol.Chem. 265, 17174-17179, 1990）。

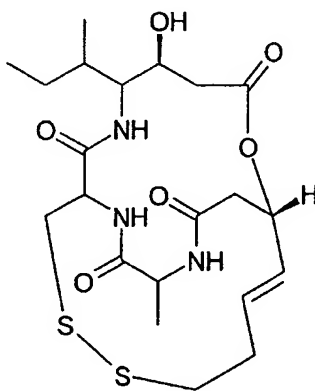
HDAC 阻害剤は、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導、アポトーシス誘導、血管新生阻害作用などを有することから、抗腫瘍剤としての効果が期待されている（Marks,P.A. et al J.Natl.Cancer Inst., 92, 1210-1216, 2000、Kim,M.S. et al Nature Med. 7 437-443, 2001）。またその他にも、例えば感染症、自己免疫疾患、皮膚病

(Darkin-Rattray, S.J. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93, 13143-13147, 1996) などの細胞増殖性疾患の治療・改善薬、またハンチントン病などの進行性神経変性疾患の予防・治療薬 (Steffan, J.S. et al Nature 413, 739-743, 2001)、導入遺伝子の発現亢進 (Chen, W.Y. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94, 5798-5803, 1997) など様々な応用も試みられており、有用な医薬となることが期待されている。

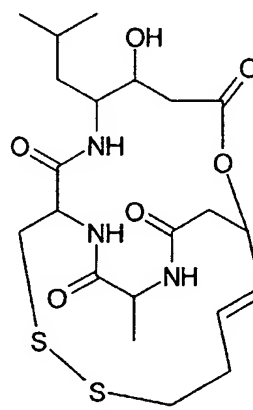
近年になって、HDAC 阻害作用を有する微生物培養物由来のデプシペプチド化合物、例えば、FK228 (非特許文献 1 参照)、及び下式で示される化合物 A, B 並びに C (特許文献 1 及び 2 参照) の報告がある。これらの化合物は良好な HDAC 阻害作用を有し、新しいタイプの抗腫瘍剤として期待されている。



化合物A



化合物B



化合物C

しかしながら、今なお、活性強度、安定性、体内動態や毒性などの更に改善された薬剤の創製が切望されている。

【非特許文献 1】 Nakajima, H.ら、「Experimental Cell Research.」、1998 年、第 241 巻、第 126-133 頁

【特許文献 1】 国際公開 WO00/42062 号パンフレット

【特許文献 2】 日本国特許出願公開特開 2001-348340 号公報

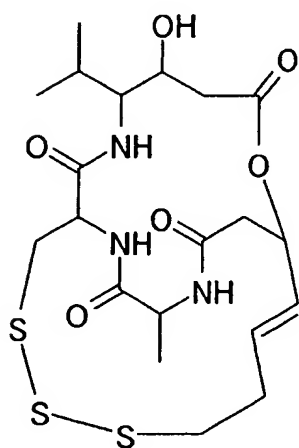
#### 発明の開示

発明者等は、天然に存在する多くの微生物が産生する化合物につき、鋭意検討した

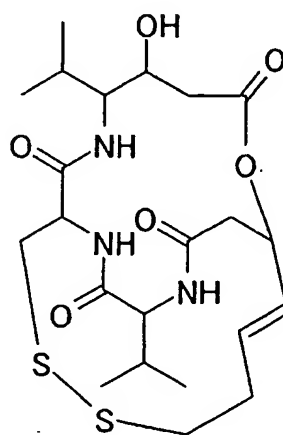
結果、シュードモナス属に属する新種の微生物 Q71576 株を見だし、該培養物から優れたヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有する新規なデブシペプチド化合物(前出の化合物 A, B 及び C) を単離した。そして、これらの化合物が優れた HDAC 阻害作用を有することを知見して、先に特許出願を行った(前記特許文献 1 及び 2 参照)。

本発明者等は、更に微生物 Q71576 株の培養物中の微量成分を単離すべく、培養条件並びに精製条件等の検討を鋭意行い、優れた HDAC 阻害作用並びにヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有する新規な類縁体化合物を単離することに成功し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、HDAC 阻害剤及び抗腫瘍剤として有用な、下式 (I) で示されるデブシペプチド化合物(化合物 Q と略記する)若しくは下式 (I I) で示されるデブシペプチド化合物(化合物 R と略記する)、またはそれらの製薬学的に許容される塩; 好ましくは、下式 (I) で表される平面構造式を有しかつ旋光度 $[\alpha]^{25}_D -349.3^\circ$  (c 0.05, メタノール溶媒) を有することを特徴とするデブシペプチド化合物の異性体、若しくは下式 (I I) で表される平面構造式を有しかつ旋光度 $[\alpha]^{25}_D -65.3^\circ$  (c 0.20, メタノール溶媒) を有することを特徴とするデブシペプチド化合物の異性体、またはそれらの製薬学的に許容される塩に関する。尚、旋光度 $[\alpha]^{25}_D$  はデータの性質上測定条件によって多少変り得るものであるから、異性体の同一性認定においてはその数値を厳密に解すべきではない。



(I)



(I I)

また、本発明は、上式 (I) 若しくは (I I) で示されるデプシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩及び製薬学的に許容される担体を含む医薬組成物、殊に抗腫瘍剤に関する。

更に、上記式 (I) 又は (I I) で示されるデプシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩の、抗腫瘍剤である医薬の製造のための使用、並びに、癌患者の治療方法であって、有効量の式 (I) 若しくは (I I) で示されるデプシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩を患者に投与することからなる方法をも含有する。

以下、本発明につき詳述する。

本発明デプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩はシュードモナス属 (*Pseudomonas*) に属する当該化合物生産菌を栄養培地にて培養し、当該化合物を蓄積させた培養物から常法によって得られる。当該化合物の製造方法において使用する微生物は、シュードモナス属に属し当該化合物の生産能を有する微生物であればいずれも用いることができる。このような微生物としては、例えば、長野県北佐久郡望月町で採集された土壌より分離されたシュードモナス属に属する細菌シュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q71576株を挙げることができる。本菌株の菌学的性状は W000/42062号公報に記載の通りである。なお、本菌株はシュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q71576として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-6944号 (寄託日1999年1月8日) として国際寄託されている。また、微生物は人工的に又は自然に変異を起こしやすいので、本発明において用いられるシュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q71576株は、天然から分離された微生物の他に、これに紫外線、X線、化学薬剤などで人工的に変異させたもの及びそれらの天然変異株についても包含する。

#### (製造方法)

本発明化合物はシュードモナス属に属し、本発明化合物生産能を有する微生物を培養することによって得られる。培養は一般微生物の培養方法に準じて行われる。

培養に用いられる培地としては、シュードモナス エスピー Q71576株が利用する栄養源を含有する培地であればよく、合成培地、半合成培地または天然培地が用いられる。培地に添加する栄養物として公知のものを使用できる。培地の組成は、例えば炭素源

としてはD-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、イノシトール、D-マンニトール、D-ガラクトース、トレハロース、キサンチン、デンプン、ブドウ糖、デキストリン、グリセリン、植物油等が挙げられる。窒素源としては肉エキス、ペプトン、グルテンミール、綿実粕、大豆粉、落花生粉、魚粉、コーンスチープリカー、乾燥酵母、酵母エキス、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿酸その他の有機、無機の窒素源が用いられる。また、金属塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄、コバルトなどの硫酸塩、硝酸塩、炭酸塩、リン酸塩などが必要に応じて添加される。さらに、必要に応じてメチオニン、システイン、シスチン、チオ硫酸塩、オレイン酸メチル、ラード油、シリコン油、界面活性剤などの生成促進化合物または消泡剤を添加することもできる。

培養条件としては好氣的条件下で培養するのが一般的に有利で、培養温度は3～32℃の範囲、好ましくは20～28℃付近で行われる。培地のpHは約4.5～9、好ましくは約5～7.5の範囲に調整すると好結果が得られる。培養期間は培地の組成、温度条件に応じて適宜設定されるが、通常1～10日程度、好ましくは2～7日程度である。

培養物より目的とする本発明化合物を単離するには、微生物が産生する代謝産物に用いる通常の抽出、精製の手段が適宜利用できる。例えば培養化合物中の該化合物は培養液をそのままか、又は遠心分離あるいは培養物に濾過助剤を加えて濾過して得られた培養液に酢酸エチル等の水と混和しない有機溶剤を加えて抽出する。また、培養液を適宜の担体に接触させ、濾液中の生産化合物を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出することにより該化合物を抽出することができる。例えば、アンバーライト（登録商標）XAD-2、ダイヤイオン（登録商標、以下同じ）HP-20、ダイヤイオンCHP-20、又はダイヤイオンSP-900のような多孔性吸着樹脂に接触させて該化合物を吸着させる。次いでメタノール、エタノール、アセトン、ブタノール、アセトニトリル又はクロロホルム等の有機溶媒を単独若しくは混合した溶媒を、又は当該溶媒と水の混合液を用いて該化合物を溶出させる。このときの有機溶媒の混合比率を低濃度より段階的に又は連続的に高濃度まで上げていくことにより、該化合物を含む画分を効率よく得ることができる場合がある。酢酸エチル、クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には、培養濾液にこれらの溶媒を加え、良く振盪し、該化合物を抽出する。次に、上記の各操作法を用いて得た該化合物含有画分は、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマト

グラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、ODSを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、再結晶等の定法によりさらに純粋に分離精製することができる。

本発明デブシペプチド化合物の製薬学的に許容される塩としては、無機若しくは有機塩基との塩であり、具体的にはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウムなど無機塩基、又は、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リジン、オルニチンなどの有機塩基との塩、あるいは、鉄などとの錯塩等を挙げることができる。

また、本発明化合物は不斉炭素原子及び二重結合を有するので、これに基づく立体異性体（ラセミ体、光学異性体、ジアステレオマー等）及び幾何異性体（シス体又はトランス体）が存在する。従って本発明化合物は、これらの立体異性体又は幾何異性体の混合物もしくは単離されたものを包含する。

さらに、本発明は、当該化合物の水和物または各種溶媒和物や、当該化合物の結晶多型も包含する。

以下に本発明化合物を有効成分として含む医薬組成物の製造方法と使用方法を詳述する。

本発明のデブシペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する医薬組成物は、通常用いられている製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、液剤、注射剤、坐剤、軟膏、貼付剤等に調製され、経口的又は非経口的に投与される。

本発明化合物のヒトに対する臨床投与量は、通常経口投与の場合、1日の投与量は、体表面積当たり約1から10000mg/m<sup>2</sup>、好ましくは10～5000mg/m<sup>2</sup>が適当であり、これを1回であるいは2乃至4回に分けて投与する。静脈投与される場合は、1日の投与量は、体表面積当たり約0.1から1000mg/m<sup>2</sup>が適当で、1日1回乃至複数に分けて投与する。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定される。

本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、一つ又はそれ以上の活性化合物が、少なくとも



も一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣または胃溶性あるいは腸溶性化合物のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エチルアルコールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に溶解補助剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射剤用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エチルアルコールのようなアルコール類、ポリソルベート80（商品名）等がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤のような添加剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これらはまた、無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

本発明化合物の溶解性が低い場合には、可溶化処理を施してもよい。可溶化処理としては、医薬製剤に適用できる公知の方法、例えば界面活性剤（ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類、ポリオキシエチレンソルビタン高級脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ショ糖脂肪酸エステル類等）を添加する方法、薬物と可溶化剤例えば高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ポリ

ビニルピロリドン(PVP)、ポリエチレングリコール(PEG)等の水溶性高分子、カルボキシメチルエチルセルロース(CMEC)、ハイドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、メタアクリル酸メチル-メタアクリル酸共重合体（オイドラギット L、S、商品名；ローム・アンド・ハース社製）等の腸溶性高分子）との固体分散体を形成する方法が挙げられる。更に必要により、可溶性の塩にする方法、サイクロデキストリン等を用いて包接化合物を形成させる方法等も採用できる。可溶化の手段は、目的とする薬物に応じて適宜変更できる〔「最近の製剤技術とその応用 I」、内海勇ら、医薬ジャーナル 157-159(1983)及び「薬学モノグラフ No.1、生物学的利用能」、永井恒司ら、ソフトサイエンス社、78-82,(1988)参照〕。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、化合物 Q の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す。

図 2 は、化合物 Q の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。

図 3 は、化合物 R の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す。

図 4 は、化合物 R の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例にて具体的に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

##### 実施例 1

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地 (pH 7.0) 100mLを、500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピー Q71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、種培養液とした。次にマンニット40g、ポリペプトン5g、肉エキス5g、硫酸マグネシウム七水和物2g、L-システイン塩酸塩一水和物0.5 g、水道水1Lを含む培地 (pH5.0) を100mLずつ500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。この培地に前記種培

養液を2mLずつ接種し、24℃、220回転／分の条件で3日間振盪培養した。

このようにして培養した培養液1Lについて、6000rpmで10分間遠心分離を行った。上清液を1M塩酸でpH3.0に調整して、酢酸エチルにて抽出し、無水硫酸ナトリウムを添加して脱水した後、減圧下で濃縮乾固した。この油状の粗抽出物をメタノールに溶解して、STR-PREP-ODS-M (20×250mm) 及びアセトニトリル/水 (30/70) を用いたHPLC (流速9ml/min) に繰り返し付し、保持時間28分から36分の画分1を得た。画分1を減圧下で濃縮乾固し、メタノールに溶解した後、さらにCOSMOSIL (20×250mm) 及びアセトニトリル/0.25%トリフロロ酢酸水 (40/60) を用いたHPLC (流速9ml/min) を行い、保持時間15.2分のピークの画分2と保持時間16.5分のピークの画分3を得た。画分2を濃縮乾固することにより化合物Q 5.6mgを、画分3を濃縮乾固することにより化合物R 11.8mgを得た。

## 実施例2

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地 (pH 7.0) 100mLを、500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピー Q71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転／分の条件で3日間振盪培養し、第一段種培養液とした。次に上記と同様の培地500mLを3L容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。これに第一段種培養液を2%の割合で接種し、28℃、200回転／分の条件で3日間振盪培養し、第二段種培養液とした。次に本培養は、300L容ジャーフェーマンターにマンニット50g、ポリペプトン5g、肉エキス5g、硫酸マグネシウム七水和物2g、L-シスチン0.5g、L(-)-プロリン0.5g、水道水1Lを含む培地 (pH5.0) 200Lを仕込み、120℃で20分間滅菌した。これに第二段種培養液を1%の割合で接種し、20℃、40回転／分、毎分200Lの通気量の条件で7日間培養した。

このようにして培養した培養液200Lを硫酸でpH3.0に調整し、シャープレス遠心機で菌体と上清液とに分離した。この上清液を20Lのダイヤイオン HP-20 (三菱化学工業社製) を充填した外径18cm、高さ150cmのカラムを通導させて、目的化合物等を吸着させた。次いで50Lの水道水で水洗した後、30%メタノール水40L、続いて30%アセ

トン水 100L で洗浄して、最後にメタノール 60L を用いて目的化合物を溶出した。この溶出液に 5L の蒸留水を加えて、減圧下で濃縮してメタノールを除去した。これに等量の酢酸エチルを加えて、pH 3.0 で酢酸エチル抽出を 3 回行った。酢酸エチル抽出液に無水硫酸ナトリウムを添加して脱水した後、減圧下で濃縮乾固し、目的化合物を含有する粗精製物を得た。

このようにして得た粗精製物 21.5g を YMC PACK Pro C18 20×250mm (YMC) 及びアセトニトリル/水 (40/60) を用いた HPLC (流速 8ml/min) に繰り返し付し、保持時間 18.0 分から 19.8 分の画分 1 を得た。画分 1 は水溶液となるまで濃縮後、凍結乾燥し、さらに YMC PACK Pro C18 20×250mm (YMC) 及びメタノール/水 (60/40) を用いた HPLC (流速 10ml/min) に繰り返し付し、画分 2 (保持時間 17.6 分) 及び画分 3 (保持時間 21.2 分) を得た。画分 2 は水溶液となるまで濃縮後、凍結乾燥することにより化合物 Q 80mg を得た。画分 3 は水溶液となるまで濃縮後、凍結乾燥したものをエタノールで再結晶することにより化合物 R 287mg を得た。

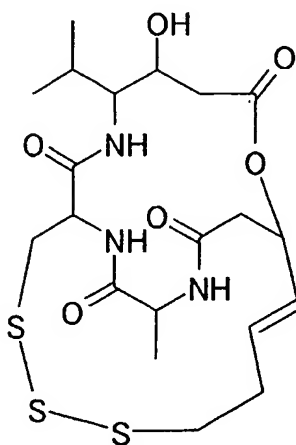
#### 本発明化合物の物理化学的性状

上記の実施例で得られた化合物 Q 及び R の物理化学的性状を下表 1 に示す。また、NMR チャートを後記図 1 ～ 4 に示す。

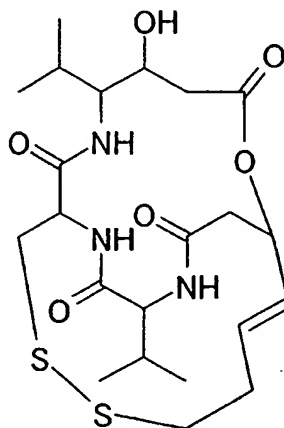
表 1

	化合物Q	化合物R
色及び形状	白色粉末	白色粉末
旋光度 $[\alpha]^{25}_D$	$-349.3^\circ$ (c 0.05, MeOH)	$-65.3^\circ$ (c 0.20, MeOH)
分子式	$C_{20}H_{31}N_3O_6S_3$	$C_{22}H_{35}N_3O_6S_2$
高分解能質量分析(FAB) 実験値 計算値	506.1442 (M+H) <sup>+</sup> 506.1453	502.2059 (M+H) <sup>+</sup> 502.2046
紫外可視吸収スペクトラム $\lambda_{max}^{MeOH}$ nm ( $\epsilon$ )	265 (1600)	End absorption
赤外吸収スペクトラム $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$	3320, 2960, 2930, 1740, 1660, 1550, 1510, 1430, 1320, 1260, 1160, 1040	3380, 3330, 2960, 2930, 2880, 1740, 1670, 1540, 1520, 1430, 1360, 1300, 1270, 1160

上記の物理化学的性状から化合物 Q 及び R の化学構造式を下記の如く決定した。

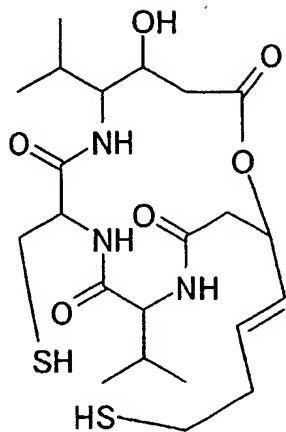


化合物 Q



化合物 R

また、化合物Rを還元することにより下式 (I I a) で示されるデプシペプチド化合物を容易に製造することが出来る。この下式 (I I a) で示されるデプシペプチド化合物は、化合物Q及びRと同様にHDAC阻害作用を有すると考えられる (特開2001-354694参照)。



(I Ia)

### 産業上の利用可能性

本発明化合物は、後記試験例に示すように、HDAC 阻害作用を有し、またヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を示すことが確認された。従って、本発明化合物は、ヒストンのアセチル化の関与する疾患や病態、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患、さらにはハンチントン病などの進行性神経変性疾患の予防・治療薬の治療及び改善に有用である。ここに、細胞増殖性疾患としては、例えば、感染症、自己免疫疾患、皮膚病が挙げられる。特に本発明化合物は良好なヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有することから、抗腫瘍剤として有用である。更に、本発明化合物は遺伝子治療におけるベクター導入の効率化や導入遺伝子の発現亢進にも有用である。

本発明化合物の有用性は以下の試験により確認されたものである。

### 試験例 1 : HDAC 阻害試験

#### (1) HDAC の部分精製

ヒト白血病由来 K562 細胞より単離した核を吉田らの方法 (Yoshida, M. et al J. Biol. Chem 265, 17174-17179, 1990) に従って抽出し、その抽出液を Q Sepharose FF カラム (ファルマシア社; 17-0510-01) を用い、0-0.5M の NaCl の濃度勾配により HDAC の部分精製を行った。その後、HDA 緩衝液 [15mM リン酸カリウム (pH7.5)、5%グリセロール、0.2mM EDTA] で透析を行った。

## (2) HDAC 阻害活性の測定

Nare, B. et al Anal. Biochem. 267, 390-396, 1999 に従って合成された、ビオチン化 [ $^3\text{H}$ ] アセチルヒストン H4 ペプチド (aa 14-21 : Biotin-Gly-Ala-[ $^3\text{H}$ -acetyl]Lys-Arg-His-Arg-[ $^3\text{H}$ -acetyl]Lys-Val-amide (Amersham Pharmacia Biotech 社)、以下 [ $^3\text{H}$ ] アセチルヒストンと略記する。) を HDAC 阻害アッセイの基質として使用した。

[ $^3\text{H}$ ] アセチルヒストンを  $60\mu\text{M}$  ジチオスレイトール(DTT)を含む HDA 緩衝液で  $37\mu\text{M}$  に希釈しこれを  $25\mu\text{l}$  と、(1) で精製・透析した HDAC 画分  $25\mu\text{l}$  とを混合し室温にて 2 時間反応させた後、 $1\text{M}$  塩酸を  $50\mu\text{l}$  添加して反応を停止させ、さらに酢酸エチル  $800\mu\text{l}$  を加え混合・遠心を行い、酢酸エチル層  $400\mu\text{l}$  をシンチレーターバイアルに採取し、 $5\text{ml}$  のシンチレーターを添加して遊離した [ $^3\text{H}$ ] 酢酸の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

基質と酵素とを混合する前に予めジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解・希釈した薬物を  $2\mu\text{l}$  添加し、上記のアッセイを行うことで、薬物の HDAC に対する阻害活性を検討した。

本発明の化合物 Q 及び R は良好な HDAC 阻害活性を示し、それぞれ  $10\text{nM}$  の濃度において 50%以上の HDAC 酵素阻害活性を示した。

## 試験例 2 : ヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制試験

96 穴テストプレート中にヒト大腸癌由来 WiDr 細胞、あるいはヒト白血病由来 K562 細胞を  $5 \times 10^3$  個/well になるよう播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $0.5\%$   $\text{CO}_2$  インキュベーター中で培養した。18 時間後、培地で希釈した溶媒 (DMSO) および種々の濃度の化合物 Q 又は R を添加し  $37^\circ\text{C}$ 、 $0.5\%$   $\text{CO}_2$  インキュベーター中でさらに 72 時間培養した。培養後、細胞の増殖を Alamar Blue (BIOSOURCE 社) を用いて測定し、 $0.1\%$  DMSO 添加・細胞ありおよび  $0.1\%$  DMSO 添加・細胞なしの条件の測定値をそれぞれ 0%阻害、100%阻害として化合物各濃度の増殖阻害%を求め、増殖を 50%阻害する濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を logistic 回帰により算出した。その結果、化合物 Q の WiDr 及び K562 細胞に対する細胞増殖阻害の IC<sub>50</sub> 値は

それぞれ 3.0nM 及び 1.4nM、また化合物 R の WiDr 及び K562 細胞に対する細胞増殖阻害の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.9nM 及び 0.6nM であり、良好な細胞増殖阻害作用を有していた。

### 試験例 3：ヒト癌細胞に対するヒストンアセチル化誘導作用

35mm ディッシュ中に K562 細胞を  $1.5 \times 10^6$  個/ディッシュになるよう播種し、その後、溶媒 (DMSO) および種々の濃度 (0.3~30 nM) の化合物 Q 又は R を添加し、37℃、0.5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 24 時間培養した。ヒストン蛋白質の抽出は以下の方法で行った。遠心分離により回収した細胞沈殿物に TEN buffer (10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 tablet / 10mL Complete mini (Roche 社)) を添加し、氷上で 10 分間放置後、遠心分離により上清を回収し、等量の 0.4 M 硫酸をよく混合し氷上で 1 時間放置した。遠心分離により上清部分を回収後、5 倍量のアセトンと混合し-20℃で 12 時間以上放置した後、沈殿物を遠心分離により回収しアセトンで一度洗浄した沈殿物を乾燥した。これを蒸留水で溶解したものをヒストン蛋白質とし、蛋白質濃度をブラッドフォード法にて定量した。ヒストン蛋白質は等量に揃えて定法に従い SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行った。一次抗体には抗アセチル化ヒストン H3 抗体 (UPSTATEbiotechnology 社) を、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ抗体 (Amersham Pharmacia Biotech 社) を使用し、ECL (Amersham Pharmacia Biotech 社) にて発光を検出した。結果、化合物 Q 又は R 処理サンプルでは溶媒処理サンプルに比較して顕著で且つ用量依存的なアセチル化ヒストン H3 のバンドが検出されたことから、本発明の化合物 Q 及び R は K562 細胞内においても HDAC を阻害しヒストンのアセチル化を亢進させていることが確認された。

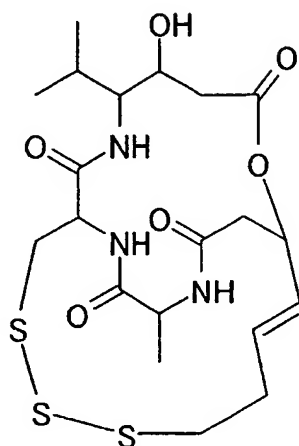
### 配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 1 の配列で表されるアミノ酸配列において、N 末端から 3 番目及び 7 番目のアミノ酸 Xaa がともに N<sup>6</sup>-[<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]acetyllysine である人工的に合成したペプチドを示す。

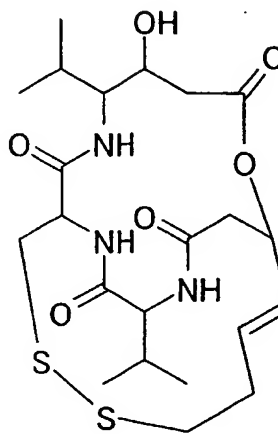


## 請求の範囲

1. 式 (I) 若しくは (I I) で示されるデブシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩。



(I)



(I I)

2. 請求の範囲 1 記載の式 (I) で表される平面構造式を有しかつ旋光度 $[\alpha]^{25}_D - 349.3^\circ$  (c 0.05, メタノール溶媒) を有することを特徴とするデブシペプチド化合物の異性体、若しくは請求の範囲 1 記載の式 (I I) で表される平面構造式を有しかつ旋光度 $[\alpha]^{25}_D - 65.3^\circ$  (c 0.20, メタノール溶媒) を有することを特徴とするデブシペプチド化合物の異性体、またはそれらの製薬学的に許容される塩。

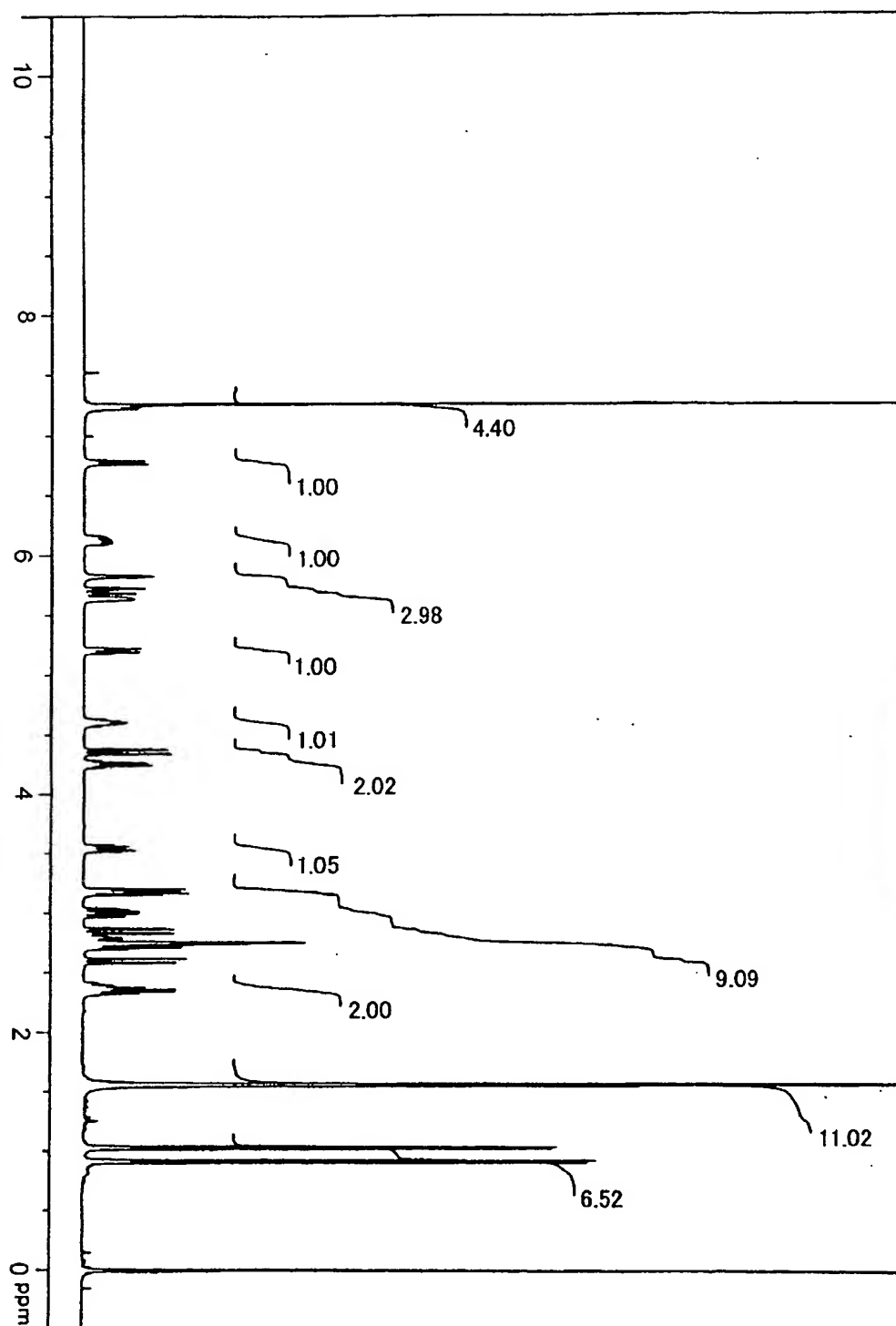
3. 請求の範囲 1 記載のデブシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩及び製薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

4. 抗腫瘍剤である請求の範囲 3 記載の医薬組成物。

5. 請求の範囲 1 記載のデブシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩の、抗腫瘍剤である医薬の製造のための使用。

6. 癌患者の治療方法であって、有効量の請求の範囲 1 記載のデブシペプチド化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩を患者に投与することからなる方法。

図 1



2

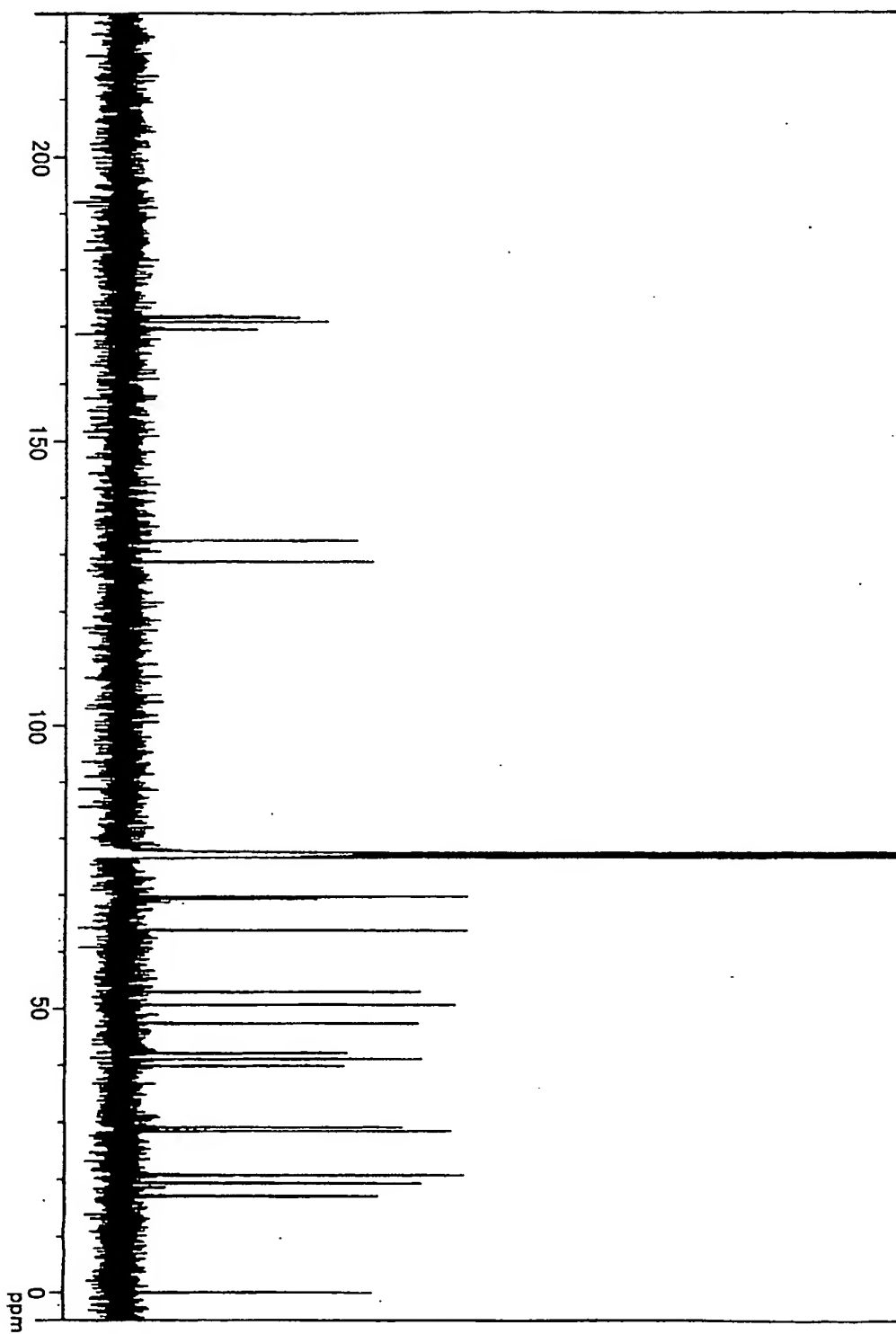
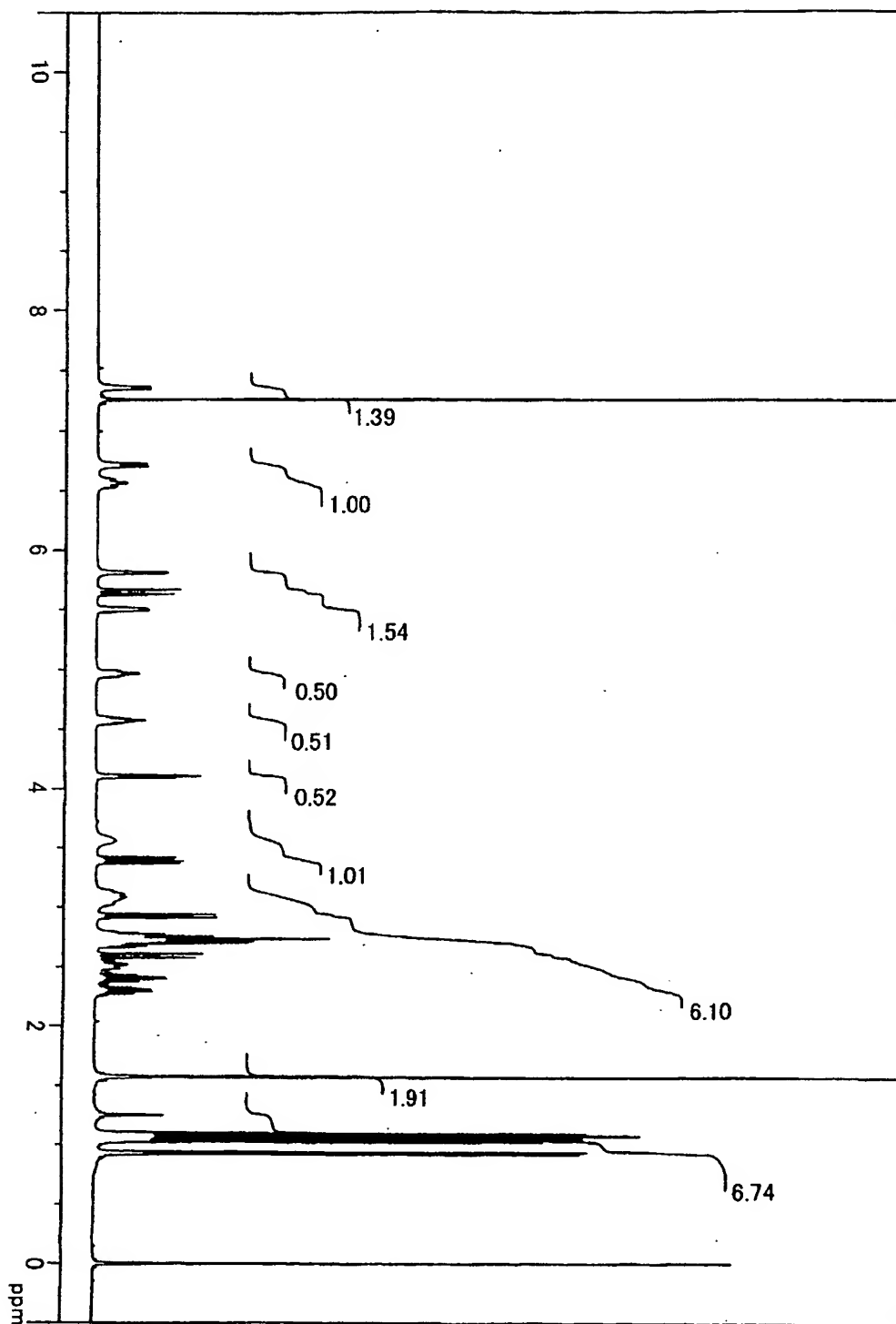
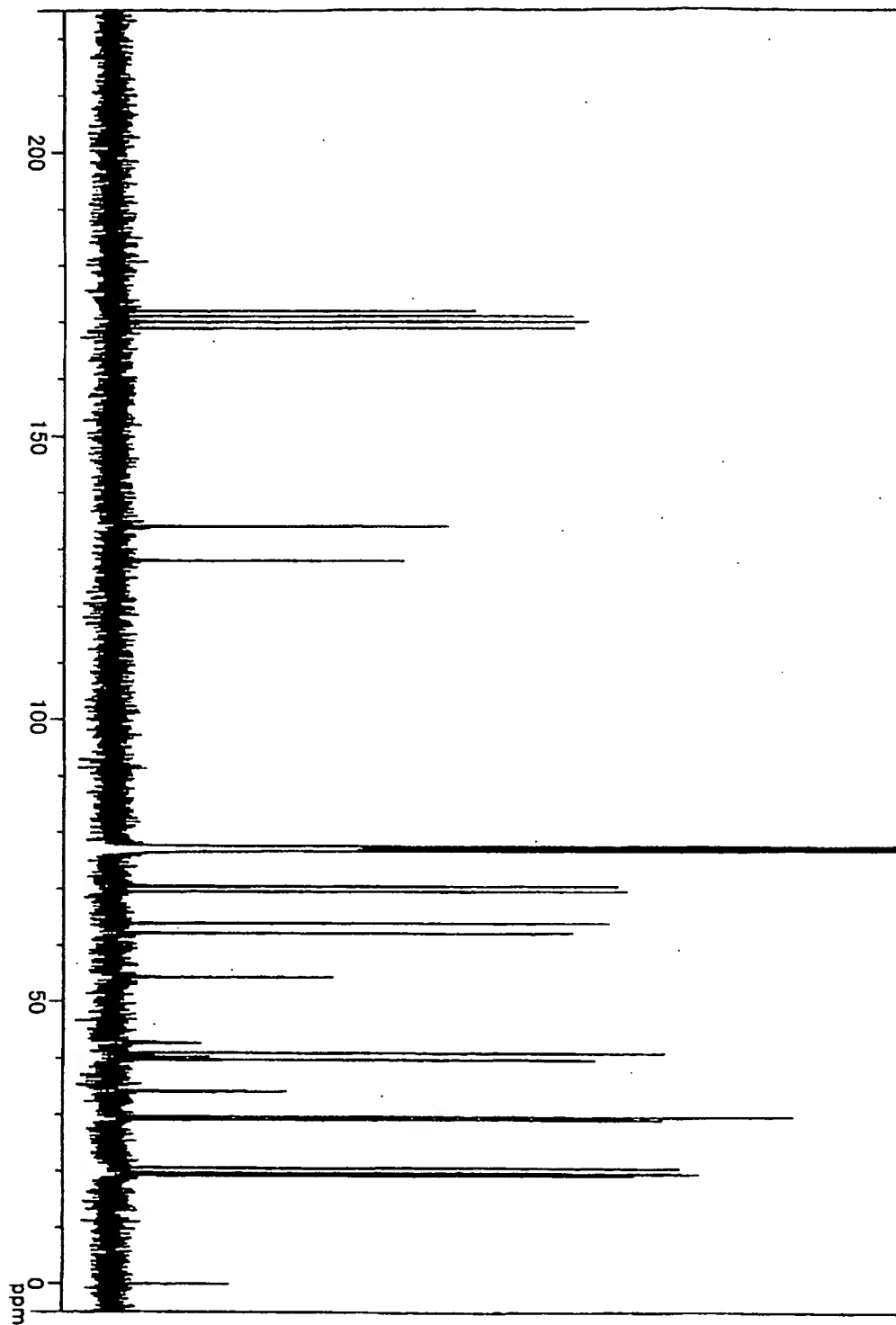


図 3



4



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Novel Depsipeptide Compounds

<130> Y0342-PCT

<150> JP2002-255141

<151> 2002-08-30

<160> 1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Nagai, Koji; Taniguchi, Masatoshi; Shindo, Nobuaki;

Terada, Yoh; Mori, Masamichi; Amino, Nobuaki; Suzumura, Ken-ichi;

Takahashi, Isao; Amase, Mitsuo

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (3)

<223> N<sup>6</sup>-[<sup>3</sup>H<sub>i</sub>]acetyllysine

<222> (7)

<223> N<sup>6</sup>-[<sup>3</sup>H<sub>i</sub>]acetyllysine

<400> 1

Gly Ala Xaa Arg His Arg Xaa Val

1

5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10957

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K5/027, C12P21/02, A61K38/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K5/027, C12P21/02, A61K38/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-348340 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 December, 2001 (18.12.01), Claims; examples (Family: none)	1-5
A	WO 00/42062 A1 (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 July, 2000 (20.07.00), Claims; examples & EP 1142905 A1 & KR 2001101443 A & CN 1335852 A	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 November, 2003 (20.11.03)

Date of mailing of the international search report  
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10957

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 pertains to method for treatment of the human body or animal body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K5/027, C12P21/02, A61K38/00, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K5/027, C12P21/02, A61K38/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-348340 A, (山之内製薬株式会社) 2001. 12. 18, 特許請求の範囲、実施例等参照, (ファミリーなし)	1-5
A	WO 00/42062 A1, (山之内製薬株式会社) 2000. 07. 20, 特許請求の範囲、実施例等参照, & EP 1142905 A1 & KR 2001101443 A & CN 1335852 A	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求項6は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(i v)の規定によりこの国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**